动 物 学 研 究 2001, Feb. 22 (1): 85~87
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

营养期和休眠期冠突伪尾柱虫的类中间纤维-核纤层-核骨架体系

Intermediate-Type Filament-Lamina-Nuclear Matrix of Vegetative Cell and Resting Cyst in *Pseudourostyla cristata*

关键词: 冠突伪尾柱虫; 营养细胞; 休眠包囊; 类中间纤维-核纤层-核骨架

Key words: *Pseudourostyla cristata*; Vegetative cell; Resting cyst; Intermediate-type filament-lamina-nuclear matrix

中图分类号: Q245 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2001)01-0085-03

近年来的研究表明，尽管不同类群的纤毛虫形成包囊过程中，细胞经历了不同程度的分化，形成不同类型的包囊，但是其休眠包囊生命活动中对细胞内物质的消化、能量利用和代谢等都具有共同的特征（顾福康等，1995，1999；李恭楚等，1999；陈灵等，2000）。这一现象提示，纤毛虫在休眠条件下的生命活动可能具有一些相同的物质和结构基础。由于在高等真核细胞中普遍存在的中间纤维-核纤层-核骨架体系对细胞生命活动起到多方面的重要作用，并且尽管目前仅对极少数原生动物观察到该结构体系，但它却预示了在这一原始的单细胞类群中以中间纤维为基本形态单元的结构体系的存在及其可能作用。本文以营养期冠突伪尾柱虫（*Pseudourostyla cristata*）及其经人工诱导获得的休眠细胞为材料，实验证实在两者中均存在所述的结构体系，这对于进一步揭示并探索休眠细胞生命活动的物质和结构基础及其可能的作用是有意义的。现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材 料

所用材料为1997年上海动物园小湖内采集，分离后建立纯系培养的冠突伪尾柱虫。

1.2 方 法

将冠突伪尾柱虫接种在直径6 cm左右的培养皿中，在20℃左右的温度下用麦粒液培养，以麦粒液孵化的细菌为食料，获得进行无性分裂生殖的纤毛虫。待纤毛虫培养至较高密度（虫体布满培养皿底部）后，在低于10℃左右的温度下继续培养，约1 d后，纤毛虫便开始形成包囊。

取处于非分裂阶段的纤毛虫及诱导获得的休眠细胞，参照Fey *et al*.（1984，1986）和Capco *et al*.（1984）的方法并稍作修改，对材料进行生化分级抽提，并制备DGD（diethylene glycol distearate）包埋去包埋透射电镜术样品，观察、照相。

生化分级抽提基本方法步骤是：收集材料，用0.1 mol/L PBS漂洗3次，每次5 min；4℃，CSK液（100 mmol/L PIPES，pH6.8；1 mol/L KCL；300 mmol/L蔗糖；10 mmol/L EGTA；300 mmol/L $MgCl_2$；5% Triton X-100）作用3~5 min，0.1 mol/L PBS漂洗3次；4℃，RSB液（10 mmol/L EGTA；425 mmol/L Tris-HCl，pH8.3；85 mmol/L NaCl；260 mmol/L $MgCl_2$；1% Tween-40；0.5% DOC）作用5 min，0.1 mol/L PBS漂洗3次；室温，在DNA缓冲液（100 mmol/L PIPES，300 mmol/L蔗糖，300 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L EGTA，50 mmol/L NaCl）中加入DNase Ⅰ至终浓度为100~200 μg/mL，作用20~25 min，CSK液漂洗，加入硫酸铵溶液至终浓度为0.25 mol/L，室温下作用5 min；0.1 mol/L PBS及双蒸水先后漂洗，弃去抽提液，获得材料的类中间纤维和核骨架体系。

DGD包埋去包埋透射电镜术样品制备的基本方法步骤是：取上述抽提的细胞骨架，4℃下用1%锇酸固定液固定30 min；0.1 mol/L二甲砷酸钠缓冲液漂洗，等级酒精脱水，正丁醇过渡；DGD（Sigma产品）包埋（按正丁醇与DGD比例依次为1:2，1:1，2:1至纯DGD逐级过渡）60℃24 h；超薄切片（厚度80~100 nm），切片置于正丁醇中，溶去DGD，等级酒精脱水，乙酸异戊酯置换，临界点干燥及电镜观察。

2 结 果

2.1 营养细胞

表膜下皮层细胞质中布满类中间纤维网络。在不同部位网络的密度不尽一致，其中比较稀疏的网络区主要含有直径10 nm左右的类中间纤维，比较致密的网络区主要含有直径10~30 nm的类中间纤维或纤维束。全部类中间纤维或纤维束中，同一纤维或纤维束在不同部位粗细也不一致，看上去似扭曲的串珠状线（图版Ⅰ1）。

收稿日期：2000-09-05；修改稿收到日期：2000-10-23
基金项目：国家自然科学基金资助项目（39670090）
E-mail：yangzhenyun@yahoo.com

在皮层细胞质深部，类中间纤维的分布显示明显的区域化特征。在细胞器和细胞质内含物丰富的区域，中间纤维在胞器或胞质内含物外缘较紧密地聚集，形成纤维束或纤维带，其纤维或纤维束直径在10~30 nm。在邻近位置的类中间纤维形成较松散的网，其纤维直径在10 nm左右(图版Ⅰ2)。

营养大核除去核膜后，外围有约40~50 nm厚的核纤层。核纤层纤维相互聚集成绳索状或条带状，其主要由直径10 nm左右的纤维组成。核纤层外附着类中间纤维，内缘则紧贴核骨架纤维。并且，其内、外两侧的这些纤维结构似乎与核纤层纤维是相互接续的（图版Ⅰ3）。

营养大核内含有核骨架纤维组成的网络结构。整个网络由直径10~30 nm的核骨架纤维及其纤维束或纤维带组成网络，其中大部分网格的大小、形态不一致，有明显的区域化特征。有时在纤维网上附着电子密度颗粒（图版Ⅰ：4，5）。

2.2 休眠包囊细胞

包囊细胞皮层区，类中间纤维成非均匀分布状态。在包囊壁下相当于表质层或邻近表质层位置，类中间纤维聚集成一定宽度的纤维带，其中由直径10 nm左右的纤维及其纤维束形成不规则的非网络结构；在表质层下皮层，类中间纤维集合成由单根纤维及其纤维束组合在一起的小区。此外，也有少数纤维及其纤维束形成网格，与所述纤维结构发生联系，而无类中间纤维分布区则成为“空白”区(图版Ⅰ6)。

在皮层细胞质深部，常见类中间纤维聚集成束或条带，把所在细胞质分隔成多个小区，其中纤维束形成封闭性结构、内部无纤维或很少有纤维，成空泡状；有的纤维束封闭结构内有类中间纤维网，但不同位置纤维网密度不一致(图版Ⅰ7)。此外，也偶见在深部细胞质位置，除类中间纤维形成的网络外，其纤维集合成粗细不一的纤维束，纤维束附着有高电子密度结构的情况（图版Ⅰ8)。

大核核纤层的大部分区域与胞质中间纤维和核内的核骨架纤维紧密聚合在一起，整个一层厚度约100 nm，该层密度较营养细胞的同种结构要高得多，且其中的纤维集成束很少见单根纤维存在。在细胞质面，类中间纤维聚集成20~30 nm的纤维束伸向核纤层，或形成密集的纤维区与核纤层发生联系。在核内，核骨架纤维和核纤层纤维紧密聚集或相互嵌合在一起，很难区分其中的单根纤维(图版Ⅰ9)。

整个核骨架网络较营养细胞的同种结构密集得多，但营养细胞核中观察到的核骨架纤维网的基本形态此时依然存在，其中由单根纤维和粗细不同的纤维束组成网络，有的网格小，有的则较大，由此使相应的网络区显示不同的密度。偶尔也见具有高电子密度的小区，这可能是核仁所在位置（图版Ⅰ10)。

3 讨 论

本文应用DGD包埋去包埋方法结合透射电镜术显示，冠突伪尾柱虫营养细胞中存在类中间纤维－核纤层－核骨架体系，该结构体系是由直径10 nm左右的纤维及其纤维束形成胞质纤维网和细胞核核纤层及核骨架纤维网，这3类纤维结构互相联系，在纤毛虫细胞内组成以中间纤维为基本形态单元的细胞骨架体系。目前，尽管对高等动物细胞中的胞质骨架和核骨架结构已有较深入的研究，但对单细胞动物所知甚少。自从在原生动物大变形虫(*Amoeba proteus*)的细胞核中观察到复杂的蜂窝状核纤层结构(Flickinger，1974)后，至今仅在鞭毛虫金黄滴虫(*Ochromonas danica*)(朱桦等，1986)和小眼虫(*Euglena gracilis*)(冯磊等，1999)及全毛目纤毛虫嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)(李秀芬等，1992；陈彬等，1994)等少数原生动物中发现这类结构体系。因此，作者在这种腹毛目纤毛虫中所得的该结构体系存在的证据不仅可对进一步了解进化程度较高的纤毛虫细胞结构的分化特征提供基础资料，并对继续探讨细胞模式形成与功能等关系也是有科学意义的。

纤毛虫形成包囊过程中，以微管为基本形态单元的细胞骨架结构如纤毛、纤毛器基部微管及附属微管、表膜下微管等全部瓦解或部分瓦解，而即使是残剩的微管也是处于非功能状态或退化状态的，形成毛基体吸收型包囊的纤毛虫例如贻贝棘尾虫（*Stylonychia mytilus*）（Walker *et al*.，1975)、苔藓织毛虫（*Histriculus muscorum*）（Matsusaka *et al*.，1984)，形成毛基体非吸收型包囊的包囊游仆虫（*Euplotes encysticus*）（顾福康等，1995）等，均是这种情况。而值得注意的是，笔者观察到，尽管冠突伪尾柱虫形成包囊过程中，大部分纤毛及纤毛附属微管、其他胞质微管退化瓦解①，休眠细胞中以中间纤维为基本形态单元的类中间纤维－核纤层－核骨架体系则依然存在，并保持了与营养细胞中同种结构基本相似的形态。这一结果表明，类中间纤维－核纤层－核骨架体系可能是纤毛虫细胞中较微管结构更为稳定的细胞骨架。并且，由于目前已在几种纤毛虫中证实，细胞休眠期间同样经历着对物质的消化、能量利用和细胞代谢等活动（李恭楚等，1999；顾福康等，1999；陈灵等，2000)，本种纤毛虫休眠细胞中所述的生命活动过程想必也是存在的。鉴于类中间纤维－核纤层－核骨架体系的稳定性特征，作者推测，在纤毛虫细胞生命活动中，该结构体系可能起到比微管细胞骨架更重要的作用。这也是我们下一步要研究的问题。

与营养期纤毛虫的同种结构比较，冠突伪尾柱虫休眠细胞中细胞核核纤层厚且致密，核骨架纤维网络也非常密集，这可能与笔者观察到的休眠细胞中有更多的染色质附着在大核核内膜，且其他大部分染色质相互聚集①，而导致相应位置的纤维结构的聚集有关。

①Gu F K, Ni B, Yang Z Y *et al*, (submit). Ultrastructural observations on the vegetative and encysting *Pseudourostyla cristata* [J]. *Acta Zool. Sin*, [顾福康，倪 兵，杨振云等，(待发表). 冠突伪尾柱虫营养期和形成包囊期间细胞结构的观察. 动物学报]

图 版 说 明

图版Ⅰ(Plate Ⅰ)

OOI：胞器或胞器内含物(area of organelle or inclusion)；IF：胞质类中间纤维(intermediate-type filament)；LA：核纤层(lamina)；NMF：核骨架(nuclear matrix filament)；NMFN：核骨架纤维网(nuclear matrix filament networks)；BN：大网络区(big network)；SN：小网络区(small network)；EDP：电子密度颗粒(electron dense particle)；CW：包囊壁(cyst wall)；VLS：泡状结构(vesicle-like structure)；HEDS：高电子密度结构(high electron dense structure)；HDN：高密度网(high dense network)；LDN：低密度网(low dense network)；NU：核仁区(nucleolus area)；1～10：标尺为0.5 μm(bar = 0.5 μm)。

1～5：营养细胞(vegetative cell)

6～10：休眠包囊(resting cell)

1. 营养细胞表膜下皮层细胞质的类中间纤维网(小箭头示单根纤维组成的网络，大箭头示纤维束组成的网络)[intermediate-type filament networks of subpelliocular cortex in vegetative *P. cristata* (small arrows show the network formed by single filaments, big arrows show the network formed by filament ribbons)]
2. 皮层细胞质深部的类中间纤维网(小箭头示单根纤维组成的网络，大箭头示纤维束或纤维带区)[intermediate-type filament networks of the cytoplasm deeps (small arrows show the network formed by single filaments, big arrows show the network formed by filament-ribbons or bands)]
3. 胞质类中间纤维、核纤层和核骨架(intermediate-type filament, lamina and nuclear matrix filament)
4,5. 核骨架纤维网(nuclear matrix filament networks)
6. 休眠包囊表膜下皮层细胞质的类中间纤维网(小箭头示纤维网，大箭头示纤维束或纤维带区)[intermediate-type filament networks of subpellicular cortex in cyst of *P. cristata* (small arrows show the filament network, big arrows show the area formed by the filament ribbon or band)]
7. 皮层细胞质深部的类中间纤维网(小箭头示纤维网，大箭头示纤维束或纤维带)[intermediate-type filament networks of the cytoplasm deeps (small arrows show the filament network, big arrows show the filament ribbons or bands)]
8. 类中间纤维束(箭头所示)及高电子密度结构[intermediate-type filament ribbons (arrows) and high electron dense structure]
9. 胞质类中间纤维(箭头所示)、核纤层和核骨架纤维[intermediate-type filament (arrows), lamina and nuclear matrix filament]
10. 核骨架纤维网(nuclear matrix filament networks)

参 考 文 献

Capco D G, Wan K M, Penman S, 1984. A new method of preparing embedment-free sections for transmission electron microscopy: applications to other three-dimensional networks[J]. *J. Cell Biol.*, **98**: 1878－1885.

Chen B, Cai S T, Zhai Z H, 1994. Investigation of nuclear lamina in *Tetrahymena thermophila*[J]. *Acta Biol. Exper. Sin.*, **27**: 153～163 [陈 彬，蔡树涛，翟中和，1994. 四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)核纤层的研究. 实验生物学报，27：153～163.]

Chen L, Ni B, Gu F K, 2000. Studies on electron microsocopic enzymo-cytochemistry of organelles of resting cyst in *Paraurostyla weissei* (Ciliophora, Hypotrichida)[J]. *Zool. Res.*, **21**(3): 199－203. [陈 灵，倪 兵，顾福康，2000. 魏氏拟尾柱虫休眠包囊细胞器的电镜酶细胞化学研究. 动物学研究，21(3)：199～203.]

Feng L, Gao C M, Li Y Z, 1999. Like-intermadiate filament system in *Euglena gracilis*[J]. *Acta Sci. Natur. Univ. Peking*, **35**: 503－508. [冯 磊，高崇明，李茵秦，1999. 眼虫中存在类中间纤维骨架体系. 北京大学学报，35：503～508.]

Fey E G, Wan K M, Penman S, 1984. Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition[J]. *J. Cell Biol.*, **98**: 1973－1984.

Fey E G, Gabriela K, Penman S, 1986. The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fraction and resinless section electron microscopy[J]. *J. Cell Biol.*, **102**: 1654－1665.

Flickinger C J, 1974. The fine structure of four "species" of *Amoeba*[J]. *J. Protozool.*, **21**: 59－68.

Gu F K, Ni B, 1995. An ultrastructural study on resting cyst of *Euplotes encysticus*[J]. *Acta Biol. Exper. Sin.*, **28**: 163－171. [顾福康，倪 兵，1995. 包囊游仆虫休眠包囊的超微结构研究. 实验生物学报，28：163～171.]

Gu F K, Ni B, Ji L M *et al*, 1999. Some ultrastructural studies on resting cysts and their organelles in *Paraurostyla weissei* (Ciliophora, Hypotrichida)[J]. *Zool. Res.*, **20**(6): 406－410. [顾福康，倪 兵，季玲妹等，1999. 魏氏拟尾柱虫休眠包囊及其细胞器超微结构的观察. 动物学研究，20(6)：406～410.]

Li G C, Gu F K, Ji L M *et al*, 1999. Studies on the cytoplasmic organelles and electron microscopic enzymo-cytochemistry of the resting cyst in *Colpoda steinii*[A]. In: China Zoological Society. Zoological Studies in China[M]. Beijing: China Forest Press. 718－721. [李恭楚，顾福康，季玲妹等，1999. 齿脊肾形虫休眠包囊的细胞器及其酶细胞化学的研究. 见：中国动物学会. 中国动物科学研究. 北京：中国林业出版社. 718～721.]

Li S F, Cai S T, Zhai Z H, 1992. Intermediate-type filament protein in *Crypthecodinium cohni*[J]. *Science Bulletin*, **37**: 2178－2181. [李秀芬，蔡树涛，翟中和，1992. 一种原始真核细胞——寇氏隐甲藻细胞中存在类角蛋白中间纤维的证实. 科学通报，37：2178～2181.]

Matsusaka T, Nakamura T, Nagata K, 1984. Ultrastructure, disintegration and formation of a cirrus in the vegetative, encysting ciliate, *Histriculus muscorum*[J]. *J. Electron Micros.*, **33**: 217－229.

Walker G K, Maugel T K, Goode D, 1975. Some ultrastructural observations on encystment in *Stylonychia mytilus* (Ciliophora, Hypotrichida)[J]. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, **94**: 147－154.

Zhu H, Chen Y Z, 1986. Microfilament-framework in the nucleus of *Ochromonas danica*[J]. *Acta Zool. Sin.*, **32**: 48－52. [朱 桦，陈阅增，1986. 金黄滴虫细胞核微丝系统的初步研究. 动物学报，32：48～52.]

杨振云　顾福康　倪 兵　季玲妹

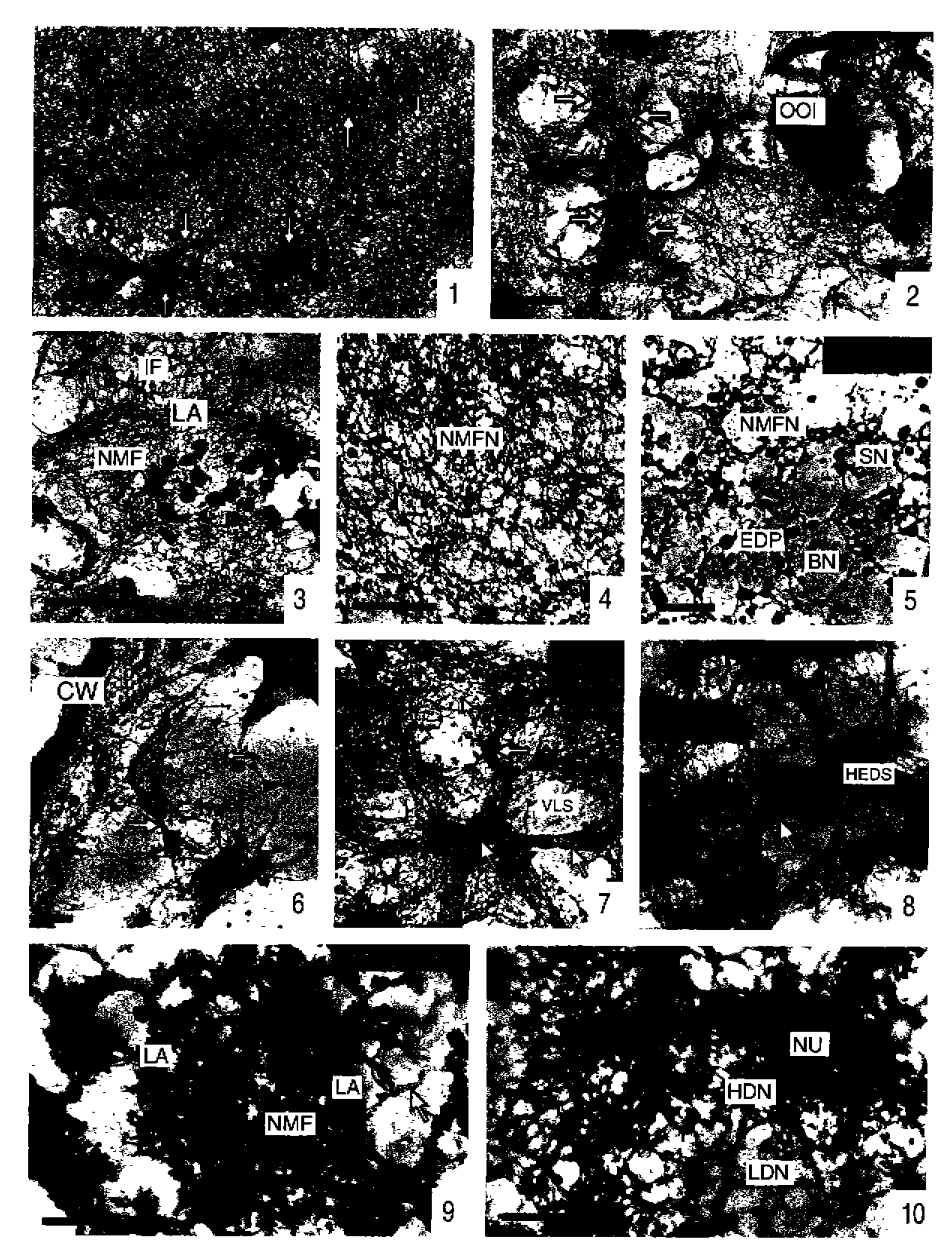
YANG Zhen-Yun　GU Fu-Kang　NI Bing　JI Ling-Mei

(华东师范大学生物系 上海 200062)

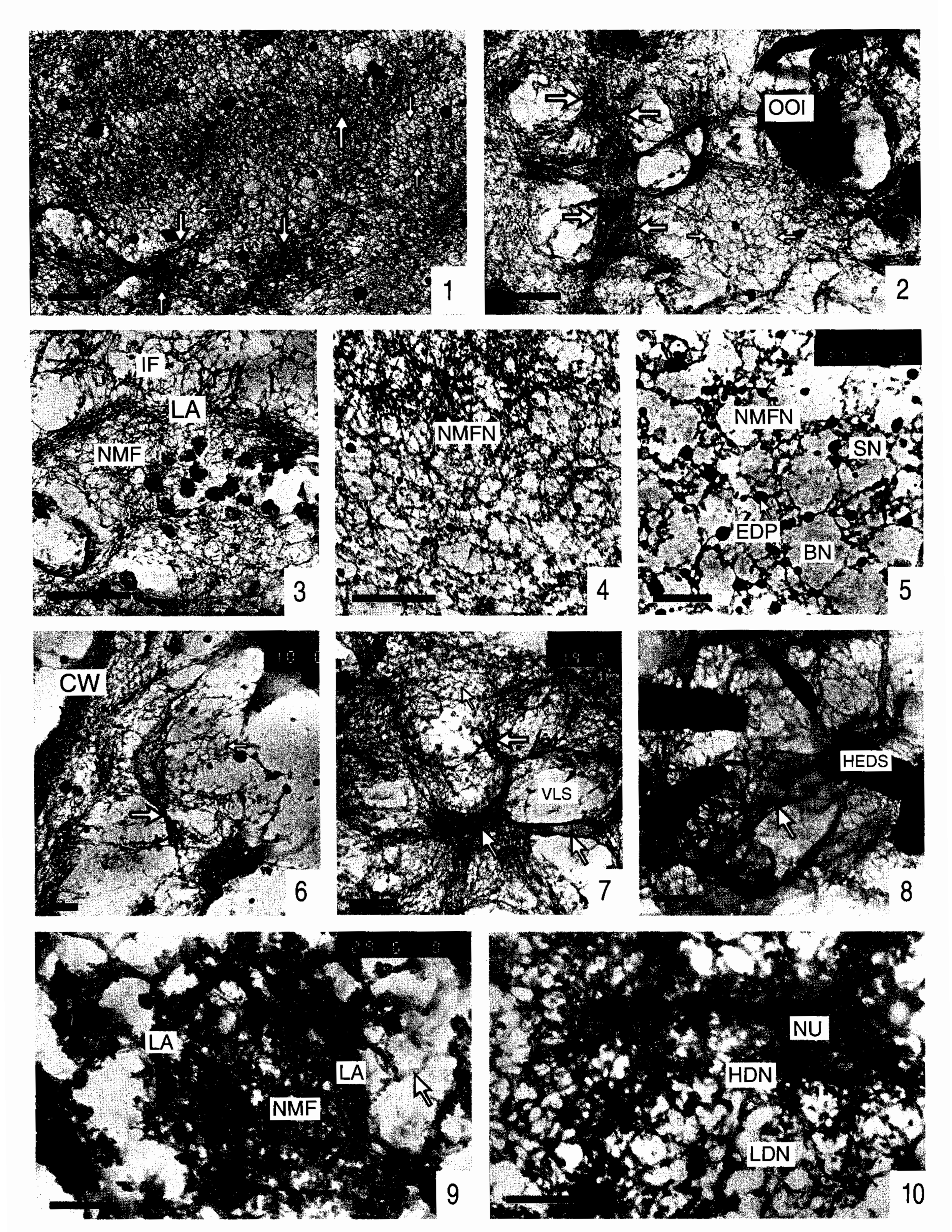
(*Department of Biology, East China Normal University, Shanghai* 200062, *China*)

杨振云等：营养期和休眠期冠突伪尾柱虫的类中间纤维－核纤层－核骨架体系　　图版 I

YANG Zhen-Yun *et al.*: Intermediate- Type Filament-Lamina-Nuclear Matrix of Vegetative Cell and Resting Cyst in *Pseudourostyla cristata*　　Plate I



图版说明在正文内 (explanation in the text)



图版说明在正文内（explanation in the text）